



ACTUALIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO EN NEUMONÍAS POR MYCOBACTERIAS.

DR. JUAN BAUTISTA GUTIÉRREZ AROCA

Servicio Microbiología Hospital Universitario Reina Sofía Córdoba

El Diagnóstico Microbiológico de la Tuberculosis se inicia con El Dr. R. Koch, cuando demostró en unas muestras de esputos de pacientes tuberculosos, la existencia del agente etiológico, aplicando un método de tinción con azul de metileno, en el Congreso de Fisiología de Berlín el 24 de Marzo del 1882. Con posterioridad consiguió cultivarlo en suero sanguíneo coagulado.

Desde entonces ha habido una gran cantidad de descubrimientos que han hecho que en la actualidad podemos diferenciar en:

La Baciloscopia. Siguiendo la tinción Franz **Ziehl** y Friedrich **Neelsen** y la fluorescencia de **Smithwick**, basadas en la ácido-alcohol resistencia de la micobacteria. Se consigue el diagnóstico y permite iniciar un tratamiento de una forma sencilla, rápida y barata.

El Cultivo. Demuestra la existencia de bacilos viables y permite clasificarlos en Complejo *M. tuberculosis* y *M. atípicas*, así como el estudio de resistencias.

En este paso se ha conseguido también grandes avances, desde los cultivos manuales, que como tipo queda el Loewenstein-Jensen a los Sistemas Automatizados, que en la actualidad el más extendido es el Bactec 960TB MGIT.

La Identificación. A partir de Cultivo

Importante en el seguimiento de la patogenicidad de la especie, es donde más avances ha habido. En su inicio se basó en una Identificación Fenotípica (Criterios Bacteriológicos Simples, Pruebas Bioquímicas, Cromatografía etc.) en la actualidad se utiliza la Identificación Genotípica, con el ahorro de tiempo y su exactitud, así como con la posibilidad de encontrar mutaciones en el ADN de las Micobacterias que se traducen en resistencias a los distintos antituberculosos. Y así las distintas técnicas.

SONDAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Sondas comerciales de ADN (AccuProbe) no radiactivas que permiten identificar por hibridación con el ARN ribosómico micobacteriano, de forma rápida (2 horas) y específica, el complejo *M. tuberculosis*, el grupo *M. avium-intracellulare*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*. Estas sondas se pueden aplicar a partir de medios sólidos y líquidos.

Tienen como inconveniente el que sólo se puede realizar una identificación por prueba. Es importante no olvidar la frecuencia de cultivos micobacterianos mixtos en pacientes inmunodeprimidos. Ello obliga a realizar un subcultivo, a pesar de una identificación positiva con la sonda de ADN para el grupo *M. avium-intracellulare* o *M. tuberculosis*, sobre todo.

INMUNOCROMATOGRAFIA

Partiendo de los estudios de bioquímicos, inmunológicos y moleculares del Complejo *M. tuberculosis* se han descubierto 33 proteínas secretadas por el Complejo *M. tuberculosis* en su crecimiento activo. Una de las proteínas predominantes es el MPT64 del Complejo *M. tuberculosis*, no siendo secretada por otra Micobacteria del Género *Micobacteria*.

Esta proteína MPT64 tiene capacidad antigénica por lo que se ha utilizado como prueba rápida por Inmunocromatografía al reaccionar frente a los Anticuerpos



monoclonales de ratón específicos.

Esta técnica se puede realizar tanto a partir de medios líquidos como sólidos y su duración máxima, es de 15 minutos.

GENOTYPE Mycobacterium CM

Permite la identificación de las siguientes especies: *M. avium* ssp, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum* / *M. ulcerans*, *M. tuberculosis complex*, y *M. xenopi*.

El proceso, se divide en tres pasos; Aislamiento del ADN, a partir de un cultivo, la Amplificación multiplex con primers marcados con biotina y una Hibridación reversa.

La reacción se produce en unas tiras de nitrocelulosa y para su interpretación se utiliza una plantilla del esquema de bandas obtenido. Siendo esta rápida y sencilla.

GENOTYPE Mycobacterium AS

Permite la identificación de las siguientes especies: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. hechesornense*, *M. sulzagi* / *M. intermedium*, *M. plei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum*, y *M. shimoidei*.

El procedimiento es igual al anterior.

GENOTYPE MTBC

Permite la diferenciación de las especies del *C. M. tuberculosis*. Identificando las siguientes especies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*.

El procedimiento es igual a los anteriores.

DETECCIÓN DE RESISTENCIAS

Métodos Fenotípicos convencionales Métodos basados en medios de cultivo sólidos.

Los métodos fenotípicos se basan en la realización del estudio de sensibilidad frente a los fármacos utilizados en el tratamiento. Se sigue el Método de las proporciones críticas, descrito por Canetti y Grosset, en que se comparan las colonias crecidas en diferentes diluciones con las presentes en medio sin antibiótico, interpretando el resultado a través de la proporción de colonias capaces de crecer en presencia del fármaco. La mayoría de métodos actuales se derivan de él. Inicialmente la técnica se diseñó para su utilización en medio de Löwenstein-Jensen y para los fármacos de primera línea, exceptuando la pirazinamida. Poco después se estandarizó para los medios 7H10 y 7H11 de Middlebrook. Más reciente el Método E-test, basado en la utilización de tiras impregnadas de antibiótico, aplicadas directamente sobre placas de medio de cultivo y que aporta la ventaja de determinar la CIM del fármaco gracias al gradiente de concentraciones del antibiótico a lo largo de la tira. Se trata de un método sencillo, aunque requiere cierta experiencia en su lectura.

Métodos Genotípicos. Métodos basados en mecanismos moleculares.

GENOTYPE MTBDR PLUS

Basado en la tecnología DNA-STRIP permite la Identificación del Complejo *M. tuberculosis* y su posible resistencia frente a Isonicida y Rifampicina mediante la detección de las mutaciones del gen *rpoB*. Se puede usar la técnica tanto a partir de muestras como de cultivo. El procedimiento se basa en la Extracción del ADN, de cultivo o muestras respiratorias, Amplificación múltiple, y la Detección por Hibridación de los amplicones, a sondas unidos a una membrana. La lectura se realiza con una plantilla aplicada a las bandas donde se realiza la hibridación.



GenoType MTBDR sl (2ª Linea)

Igual fundamento que el anterior. Detecta mutaciones a: ETAMBUTOL, AMIKACINA, CAPREOMICINA, KANAMICINA, y QUINOLONAS

MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

IDENTIFICACIÓN DIRECTA

PCR Taqman MTB Test (Roche)

Es una prueba de Amplificación del A. Nucleico para la detección cualitativa del ADN del Complejo M. tuberculosis en muestras respiratorias.

Se basa en la Extracción del ADN de la Micobacteria, a continuación se realiza la Amplificación de este, mediante primers complementarios y por ultimo la Detección del ADN amplificado a tiempo real mediante, la escisión de sondas oligonucleótidas marcadas con doble marcador fluorescente, que permite detectar la acumulación del producto amplificado.

Tiene un control interno que se amplifica independientemente.

Genotype Mycobacterium Direct (GTMD)

Se trata de una nueva técnica de microbiología molecular basada en las tecnologías NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) y DNA-STRIPS® que nos permite mediante la amplificación de 23S rRNA, la detección de M. tuberculosis Complex, M. avium, M. intracellulare, M. kansasii, y M. malmoense directamente de los especímenes clínicos respiratorios descontaminados.

La prueba se divide en tres partes fundamentalmente:

- En la primera parte, se realiza la estabilización y el aislamiento de ARN de los especímenes descontaminados mediante un método de captura (sonda de captura-bolitas magnéticas):
- En la segunda parte de la técnica se produce la amplificación isotérmica del ARN mediante NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)
- Por último, en la tercera etapa del proceso, se realiza la detección del producto amplificado mediante hibridación inversa ésta, se realiza mediante un sistema automatizado (ProfiBlot Tecan®, Maennedorf, Switzerland), que nos permite la agitación, calentamiento y dispensación de los reactivos necesarios para la reacción de detección.

GENOTYPE MTBDR PLUS

Ya descrito

GENOTYPE MTBDR sl (2ª Linea)

Igual fundamento que el anterior

GENE X PERT

Es una prueba diagnóstica de PCR semicuantitativa, y en tiempo real y que se utiliza para la detección de compuestos de ADN del M. tuberculosis en muestras respiratorias, si bien tienen cierta rentabilidad en otro tipo de muestras (LCR, L. articular, L. pleural, A. gástricos, Biopsias, etc.) y en la detección de mutaciones asociadas a la resistencia de la Rifampicina, esta pensada para muestras de pacientes no tratados con rifampicina.

El sistema está automatizado e integra, la Extracción mediante el procesamiento de la muestra, la Amplificación por la multiplicación del A. Nucleico y la Detección de las secuencias diana en muestras sencillas o complejas mediante ensayos de PCR y PCR transcriptasa inversa en tiempo real. El Sistema permite el procesamiento individual de cada muestra. Todo el proceso se realiza en cartuchos desechables, eliminando la posibilidad de contaminación cruzada entre las muestras.

**INNO-LiPA RIF.TB line probe assay.**

Consiste en una amplificación mediante nested-PCR (reamplificación) de una región del gen *rpoB* que codifica la subunidad beta de la ARN polimerasa presente en todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*, seguida de una hibridación inversa. El híbrido se detecta mediante una reacción calorimétrica que está automatizada (AUTOLiPA). El ensayo se completa en aproximadamente 12 horas. El sistema LiPA sirve para detectar el complejo *M. tuberculosis* y, a la vez, la resistencia a la rifampicina.

